FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

N° 7

CONTRIBUTION
à l'étude des produits d'acétolyse de l'amidon

THÈSE

présentée et publiquement soutenue
devant la Faculté de Médecine et de Pharmacie
de Marseille

NOVEMBRE 1966

par

Roger FABRE

né le 27 Novembre 1929 à Voiteur (Jura)

Pharmacien

Diplômé de Phytopharmacie

Certifié d'Optique et d'Acoustique Médicales

Certifié de Bactériologie de Parasitologie et de Sérologie

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Examinateurs de la Thèse	MM. C. DUMAZERT,	Professeur	Président
	F. PELLISSIER	»	
	M. MOURGUE	»	Assesseurs
	J. PASTOR,	»	
	G. GHIGLIONE	Agrégé	

IMP. LINO-IMP - MARSEILLE - TÉL : 77.92.48

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545823_0036

Roger FABRE

Pharmacien — Diplômé de Phytopharmacie
Certifié d'Optique et d'Acoustique Médicales
Certifié de Bactériologie, de Parasitologie et de Sérologie

CONTRIBUTION
à l'étude des produits d'acétolyse de l'amidon

Travail du Laboratoire de Chimie
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Marseille

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Marseille

PERSONNEL ADMINISTRATIF

Doyen : G. MORIN
Secrétaire Principal : P. MOUCHET
Secrétaire Principal honoraire : J. COMTE
Bibliothécaire : M^lle^ PERRIN

Assesseurs :
C. GREBUS et J. LAMY

PERSONNEL ENSEIGNANT

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. AUDIBERT, BREMOND, JOYEUX, MONGES, ROCHE, CHAUVIN, MATTEI, DE VERNEJOUL.

PROFESSEURS TITULAIRES DE CHAIRE

Anatomie	MM. GRISOLI
Anatomie Appliquée et Chirurgie expérimentale	HENRY
Anatomie Pathologique	GASTAUT
Bactériologie et Pathologie générale	BRAHIC
Biochimie Médicale	LISSITZKY
Botanique et Cryptogamie	PELLISSIER
Cardiologie clinique et expérimentale	JOUVE
Chimie	DUMAZERT
Chimie Analytique et Hydrologie	ARNOUX
Chimie Biologique	DERRIEN
Chimie Minérale	MOURGUE
Clinique Chirurgicale	CARCASSONNE
Clinique Chirurgicale	LAMY
Clinique Chirurgicale	LENA
Clinique Chirurgicale Infantile et Orthopédie	SALMON
Clinique de Chirurgie thoracique	DOR
Clinique d'Endocrinologie	VAGUE
Clinique Exotique	BLANC
Clinique Médicale	N...
Clinique Médicale	AUDIER
Clinique Médicale thérapeutique	OLMER
Clinique des Maladies infectieuses	RAYBAUD
Clinique des Maladies des voies digestives et de la nutrition	RECORDIER
Clinique Médicale infantile	GIRAUD
Clinique de Neurologie et Psychiatrie	N...
Clinique Neuro-Chirurgicale	PAILLAS
Clinique Obstétricale et Gynécologique	CHOSSON
Clinique Ophtalmologique	JAYLE
Clinique Oto-Rhino-Laryngologique	APPAIX
Clinique Pneumo-Phtisiologique	CHARPIN
Clinique de Stomatologie	MARONNEAUD
Clinique Urologique	DUCASSOU
Histologie et Embryologie	PICARD
Histologie et Embryologie	STAHL
Hygiène et Médecine sociale	SAUTET
Matière Médicale	N...
Médecine expérimentale	DONNET
Médecine légale et Médecine du travail	MOSINGER
Parasitologie	RANQUE
Pathologie chirurgicale	GRANJON
Pathologie interne	MONGES H.

Pharmacologie	MM. MERCIER F
Pharmacie chimique et Toxicologie	N...
Pharmacie Galénique	DELPHAUT
Physiologie	MORIN
Physiopathologie des voies respiratoires	LAVAL
Physique	DUBOULOZ
Physique Médicale	ROUX
Thérapeutique	PIERI
Zoologie et Microbiologie	GREBUS

PROFESSEURS TITULAIRES A TITRE PERSONNEL

MM. HADIDA	Dermato-syphiligraphie
HOUEL	Chirurgie thoracique et Chirurgie du cœur
LAFFARGUE	Anatomie pathologique
MERCIER J.	Pharmaco-dynamie et Biologie humaine
PAYAN	Anatomie pathologique
SUTTER	Psychiatrie
TISSIE	Oto-Rhino-Laryngologie
VIALA	Toxicologie

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM.	MM.	M.
BERNARD P.	DESANTI	TAMALET
DEPIEDS	PASTOR	

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

MM	MM.	MM.
GAMBARELLI	MURATORE	PLASSE
CORRIOL	RICHELME	TARANGER
CRISTAU	VITRY	NICOLI
GEVAUDAN	ZWIRN	ROLLAND
ARDISSON	BERNARD P.-M.	SEITE
BARET	DUMON	TOGA
COURBIER	GASCARD	DE VERNEJOUL
GHIGLIONE	IMBERT	CHEVROT

AGREGES EN EXERCICE

MM.	MM.	MM.
CHAUVIN	LEGRE	COIGNET
DEVIN	REBOUD	JEAN
MOUREN	SARLES	JULIEN
ORSINI	SIMONIN	LACHARD
BERARD	TEMIME	MICHOTEY
BONNAY	TRIFAUD	MONGIN
COMITI	BOUDOURESQUE	BRICOT
DALMAS	BREMOND	MONGES A.
FARNARIER	CARCASSONNE M.	RUF
GERARD	CARCASSONNE Y.	
GARES	CASANOVA	

AGREGES LIBRES

MM.	MM.	MM.
BERTHIER	OLLIVIER	PAOLI
BOURRET	OURGAUD	SERMENT
FIGARELLA	BERNARD R.	

A MES PARENTS

A MA FEMME

A MES FILS

A MA FAMILLE

A MES AMIS

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur Christian DUMAZERT

Professeur de Chimie à la Faculté
de Médecine et de Pharmacie de Marseille

Nous le prions d'accepter l'expression de notre respectueuse gratitude pour l'enseignement qu'il nous a donné, pour l'intérêt qu'il a manifesté à notre travail, et pour le grand honneur qu'il nous a fait d'accepter la Présidence de notre Jury de Thèse.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur Fernand PELLISSIER

Nous l'assurons de notre reconnaissance pour l'intérêt qu'il a pris à ce travail et nous lui présentons notre hommage respectueux.

Monsieur le Professeur Marcel MOURGUE

Nous gardons le souvenir de son enseignement et nous voulons lui exprimer notre déférente gratitude et notre respectueux attachement.

Monsieur le Professeur Jean PASTOR

Nous le remercions des conseils qu'il nous a prodigués et nous sommes honorés qu'il accepte de juger ce travail.

Monsieur le Professeur Agrégé Claude GHIGLIONE

Qui a guidé avec une amicale bienveillance nos premiers travaux et qui nous a permis de mener ce travail à bien.

Nous gardons le souvenir de son dynamisme et tenons à lui exprimer notre sincère et profonde gratitude.

A Monsieur Pierre FAURE

Président du Conseil Central C
de l'Ordre National des Pharmaciens

A TOUS NOS CAMARADES

du Laboratoire de Chimie
en témoignage d'amitié.

SOMMAIRE

Pages

INTRODUCTION 19

I. — AMYLOSE ET AMYLOPECTINE 19

II. — LES AMIDONS SOLUBLES 21

III. — ANALYSE DE L'AMIDON 23

IV. — PROPRIETES CHIMIQUES DE L'AMIDON 25

A) Ethérification de l'amidon : méthylation 25

B) Estérification de l'amidon 26

C) Acétolyse 27

D) Oxydo-hydrolyse 27

E) Oxydation 28

V. — DEGRADATION ENZYMATIQUE DE L'AMIDON : *LES AMYLASES* 28

VI. — STRUCTURE DE L'AMIDON 30

OBJET DU TRAVAIL 33

RECHERCHES PERSONNELLES 35

Chapitre premier. — SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR "COUCHES MINCES" DES PRODUITS D'ACETOLYSE DE L'AMIDON 35

I. — *MATERIEL ET TECHNIQUES* 35

A) *Préparation de l'amidon soluble et de l'amidon acétylé* 35

1. Préparation de l'amidon soluble de DUMAZERT et SANTONI 35

a - amidon soluble selon LEULIER 36

b - amidon soluble de DUMAZERT et SANTONI 36

2. Préparation de l'Acétyl-amidon selon REICH et DAMANSKY 36

B) *Acétolyse de l'amidon* 37

1. Acétolyse de l'amidon selon SUTRA..... 37

2. Acétolyse selon HESS et FRIESE 37

C) *Analyse des produits d'acétolyse par chromatographie sur "couches minces"* 37

1. Préparation du support chromatographique..... 38

2. Solvant de migration 38

3. Développement de la chromatographie 38

4. Révélation des esters acétiques de glucides..... 38

a - technique de DUMAZERT, GHIGLIONE et PUGNET 39

b - révélation par la réaction de MOLISH..... 39

5. Enregistrement des chromatoplaques par photométrie directe 40

II — *RESULTATS EXPERIMENTAUX* 40

A) Acétolyse des amidons et de l'acétyl-amidon 41

B) Séparation des esters acétiques de glucides résultant de l'acétolyse de l'amidon, par chromatographie sur "couches minces" 42

C) Identification des composés a et c par chromatographie sur "couches minces" 43

Chapitre deuxième. — SEPARATION DES PRODUITS D'ACETOLYSE DE L'AMIDON PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE 44

I. — *MATERIEL ET TECHNIQUES* 44

A) Technique chromatographique 44

B) Dosage des groupements acétyls des esters présents dans les effluents 47

II. — *RESULTATS EXPERIMENTAUX* 49

Chapitre troisième. — DETERMINATION DES POIDS MOLECULAIRES D'ESTERS ACETIQUES PROVENANT DE L'ACETOLYSE DE L'AMIDON..... 51

RESUME et CONCLUSIONS 55

BIBLIOGRAPHIE 57

INTRODUCTION

L'extraction mécanique de l'amidon à partir des cellules végétales conduit à une poudre blanche, onctueuse au toucher, qui pressée entre les doigts fait entendre un crissement caractéristique. A l'examen microscopique cette poudre se révèle constituée par des grains dont la forme, caractéristique pour chaque végétal, permet son identification. Ces grains tantôt simples, tantôt agglomérés entre eux sont soit sphériques, soit ovales, soit polyédriques. Dans un grand nombre de grains on observe nettement des couches concentriques qui semblent rangées autour d'un noyau : le hile. Au microscope polarisant, les grains présentent le phénomène de biréfringence, ce qui se traduit par l'apparition d'une croix noire (GILLIS, 27).

ROBERTS (67) a montré que la structure du grain d'amidon est la même que celle du plastide dans lequel il a pris naissance. Ceci explique que la forme du grain d'amidon est caractéristique de la plante d'où on l'extrait et que la fragilité de sa structure est comparable à celle de la protéine à partir de laquelle il a été élaboré.

L'amidon est un colloïde, c'est-à-dire une macromolécule non dialysable, insoluble dans l'eau froide. Soluble dans l'eau chaude, il donne par refroidissement une bouillie gélatineuse, présentant l'effet TYNDALL : l'empois d'amidon. De par sa consistance cet empois se prête mal aux déterminations physiques, chimiques et biochimiques.

La première question qui se pose est de savoir si l'amidon naturel répond à un composé chimiquement défini et homogène ou au contraire s'il est constitué de divers polyholosides. Le problème de l'homogénéité ou de l'hétérogénéité de l'amidon a été et demeure tout au long de son histoire un sujet de controverse.

I. — AMYLOSE ET AMYLOPECTINE

La distinction entre deux constituants de l'amidon résulte des travaux réalisés en 1900 par MAQUENNE et ROUX (53). Au cours

du vieillissement d'un empois d'amidon il se dépose peu à peu une substance amorphe, non colorable à l'iode et plus résistante que l'amidon naturel à l'action hydrolysante des agents chimiques et enzymatiques. Le précipité isolé se redissout en présence de bases et dans l'eau à une température comprise entre 110° C et 120° C. Les solutions obtenues se colorent à nouveau par l'iode et le constituant soluble est facilement hydrolysable. Si on abandonne ces solutions elles donnent à nouveau un précipité constitué d'une substance non colorable par l'iode et résistant à l'action de l'amylase. MAQUENNE (52) désigne la substance non colorable à l'iode sous le nom d'*amidon rétrogradé*. MAQUENNE et ROUX (53) concluent que l'amidon est constitué de deux substances différentes : l'*amylose* soluble dans l'eau froide donnant avec l'iode une coloration d'un bleu très pur, facilement hydrolysée par les acides et les amylases et l'*amylopectine*, corps hypothétique, responsable de la formation d'empois, ne se colorant pas par l'iode.

De nombreux procédés ont été décrits dans le but de séparer l'amylose de l'amylopectine (MAQUENNE, SAMEC, TANRET, M^me^ GATIN-GRUZEWESKA, PRINGSHEIN). En 1930, BALDWIN (4) montre que l'on peut extraire de l'amidon naturel, par traitement par l'eau à 70° C - 80° C ou à l'aide d'une solution aqueuse à 30 p. 100 d'hydrate de chloral, une substance constituée vraisemblablement par un mélange de macromolécules de poids moléculaires compris entre 10.000 et 60.000. Le résidu de cette opération n'est pas complètement hydrolysé par la béta-amylase : cet enzyme le dégrade partiellement en maltose et en béta-dextrine (amylodextrine de BAKER - 3).

Il n'est pas douteux que le procédé le plus classique d'isolement et de séparation de l'amylose et de l'amylodextrine ait été proposé par SCHOCH (71). Lorsque l'on traite un empois d'amidon à l'autoclave en présence de butanol on obtient une liqueur claire qui par refroidissement abandonne un précipité correspondant à environ 22 p. 100 du poids du produit mis en œuvre. Cette fraction (fraction A) est soluble dans l'eau chaude, elle subit rapidement la rétrogradation et après dessication elle devient insoluble. La liqueur butanolique froide additionnée d'une quantité convenable de méthanol abandonne alors un nouveau précipité (fraction B). Les auteurs anglo-saxons désignent actuellement la fraction A sous le nom d'*amylose* et la fraction B sous le nom d'*amylopectine*. La définition de ces termes est différente de celle initialement proposée par MAQUENNE et ROUX et les produits ainsi désignés ne sont pas comparables.

Parmi les nombreux alcools proposés pour remplacer le butanol dans la méthode de séparation de SCHOCH signalons le méthanol ainsi que le pentasol (mélange de pentanols [SCHOCH, 72]). WHISTER et HOLBERT (81) utilisent des nitroparaffines, BOURNE et collaborateurs (9) le thymol ou le cyclohexanol, HOPKINS et JELINECK (40) mettent en œuvre une technique mixte employant à la fois le thymol et le cyclohexanol.

L'absorption d'une partie de l'amidon naturel par la cellulose est connue depuis longtemps. En 1946 ASHFORD et collaborateurs (2) préconisent une technique de séparation de l'amylose et de l'amylopectine en faisant passer un empois d'amidon sur une colonne garnie de coton hydrophile. L'amylose est retenue, tandis que l'amylopectine passe dans l'effluent. L'amylose est éluée par traitement à l'eau chaude. Malgré son principe séduisant cette méthode n'a pas donné de grandes satisfactions en pratique. BOURNE et collaborateurs (10) montrent que l'amylopectine est préférentiellement absorbée par l'alumine. LING et NANJI (47) opèrent en provoquant la précipitation d'alumine native dans l'empois par déplacement du sulfate d'aluminium dissous par une liqueur barytique.

D'autres procédés sont décrits, en particulier par HAWORTH et collaborateurs (33), par HOBSON, PIRT, WHELAN et PEAT (38). L'analyse de l'amidon naturel et des fractions amylose et amylopectine a été effectuée par électrophorèse en veine liquide par NORTHCOTE (58) et par filtration moléculaire sur Sephadex par NORDIN (57).

II. — AMIDONS SOLUBLES

Nous avons déjà dit que l'empois d'amidon se prête mal à l'analyse. De nombreux auteurs et en particulier VANHENS (77) ont montré qu'au cours de la solubilisation de l'amidon au moyen des agents chimiques et physiques suivie d'une précipitation par l'alcool fort les produits isolés sont souillés de dextrine et d'autres polyosides réducteurs. Il est très difficile d'obtenir une substance qui soit « le plus près possible de l'amidon naturel » (loc. cit.). Certains procédés trop énergiques ont été abandonnés. SUTRA (75) ne retient en 1950 que trois techniques permettant d'obtenir des *amidons solubles* n'ayant subi qu'une dégradation négligeable. La première décrite par LINTNER (49) en 1886, consiste à agiter pendant deux heures l'amidon naturel dans une solution N d'acide chlorhydrique ; la seconde, proposée par WOLFF et FERNBACH (83) en 1905, consiste à agiter le polyoside naturel pendant une heure dans une solution 0,04 N d'acide chlorydrique ; la troisième est celle de LEULIER (46) (1915).

L'amidon soluble selon LEULIER est obtenu en faisant agir sur l'amidon naturel l'acide sulfurique en solution dans l'alcool à 95° à l'ébullition pendant quinze minutes. Cet amidon conserve la plupart des caractères de l'amidon naturel. C'est une poudre qui, examinée au microscope, se montre formée de grains ayant encore la structure de ceux de l'amidon d'où il tire son origine et qui présente encore nettement le phénomène de la croix noire. Il est soluble dans l'eau chaude à 70° C. Ce procédé présente l'intérêt de permettre de purifier l'amidon naturel en le débarras-

sant des impuretés, minérales entre autres, qui souillent la surface du grain, sans pratiquement le dégrader.

Les amidons de WOLF-FERNBACH, de LINTNER et de LEULIER se dissolvent dans l'eau chaude en donnant des solutions parfaitement limpides et ne présentant pas d'effet Tyndall. On ne peut distinguer dans ces amidons les fractions A et B de SCHOCH (SUTRA, 75). Cet argument plaide en faveur du fait que ces fractions sont des produits de dégradation et non des constituants de l'amidon naturel.

MALFITANO et CATOIRE (55) développent l'hypothèse de l'amidon considéré comme un polymère de polymères. En effet, si BATES et collaborateurs (5) admettent qu'il existe deux constituants dans l'amidon correspondant à des produits de propriétés fortement tranchées, certains auteurs supposent que l'amylose et l'amylopectine sont deux types extrêmes : l'amidon naturel est constitué d'un ensemble de molécules ayant tous les degrés de propriétés intermédiaires entre ces deux substances. On peut penser, en effet, que l'eau à chaud et à froid conduit à une véritable dénaturation de l'amidon avec libération de liaisons de cohésion. L'eau pénètre dans le réseau et provoque la formation de deux phases. On sait, en effet, que sous l'influence d'un solvant les macromolécules sont fractionnées en une phase fluide et une phase de forte viscosité ou phase coacervée. On peut également envisager (EFFRONT, 21) une dépolymérisation de l'amidon en dérivés qui ont la propriété de se repolymériser à nouveau pour donner des produits différents de la substance initiale. On peut admettre l'existence dans l'amidon naturel de liaisons fragiles. Ceci pose le problème fondamental de la nature de ce type de liaison qui permet la dépolymérisation aisée de la macromolécule mère. Ce type de liaison serait responsable du spectaculaire phénomène de liquéfaction de l'amidon sous l'influence de l'alpha-amylase. Les faits ne peuvent alors être en accord avec l'idée que la liquéfaction est le résultat d'une hydrolyse partielle de quelques unités de l'amylose et de l'amylopectine. Il semble logique d'admettre que ce type de liaison est susceptible d'être renforcé sous des influences variées et en particulier sous celle des alcalis.

Ceci permet de comprendre l'intérêt que l'on peut attacher à l'amidon soluble de DUMAZERT et SANTONI (19). Ces auteurs préparent tout d'abord l'amidon de LEULIER, puis dans une deuxième phase cet amidon est traité par une lessive de soude. La clarification du milieu est alors complète. L'addition au milieu d'alcool fort précipite un dérivé sodique de l'amidon du type alcoolate. La partie glucidique de ce dérivé est précipitée par l'éthanol à partir de la solution aqueuse acide du dérivé sodique. Le rendement de l'ensemble de ces opérations est de 100 p. 100. Les caractères de cet amidon soluble sont identiques à ceux de

l'amylose pure de LING et NANJI (47). Il est soluble à froid et il peut être identifié à l'amylon de REICH et DAMANSKY (66).

Il n'existe pas à l'heure actuelle de démonstration probante de l'homogénéité ou de l'hétérogénéité de l'amidon naturel. Aussi est-il toujours indispensable de préciser la substance étudiée définie par ses critères de préparation.

III. — ANALYSE DE L'AMIDON

Les recherches sur l'amidon ont débuté il y a environ un siècle (O'SULLIVAN (1870), KJELDAHL (1876-1882), BROWN (1879), LINTNER (1991), LING et BAKER (1895). Elles ont montré que l'hydrolyse de l'amidon en milieu chlorhydrique conduit à du glucose. L'hydrolyse enzymatique au moyen des amylases de diverses origines libère du maltose et des polyosides de faible poids moléculaire (amylodextrine). L'amidon est alors considéré comme un polymère de glucose de formule brute $(C_6H_{10}O_5)_n$.

Des traces de composés minéraux accompagnent le polyoside dans l'amidon naturel. Parmi ceux-ci l'acide phosphorique serait lié sous forme d'ester dans certains amidons (pomme de terre) et sous forme de phosphatide dans d'autres (blé) (SUTRA). Ces deux formes de phosphore sont unies à la molécule amylacée respectivement par une liaison solide et par une liaison lâche. La silice a toujours été trouvée dans l'amidon naturel sans que l'on possède de données sur la manière dont elle est liée (54). Des cations (Ca^{++}, Mg^{++}, K^+, Na^+) sont également présents.

L'amylose aussi bien que les amidons solubles sont pratiquement dépourvus de substances minérales. Aucune analyse élémentaire n'a été effectuée sur l'amylose, seul l'amidon soluble de DUMAZERT et SANTONI a été étudié par DUMAZERT en 1950 (42). L'auteur conclut que la formule brute de l'amidon est infiniment plus proche de $(C_{12}H_{22}O_{11})_n$ que de $(C_6H_{10}O_5)_n$. En effet, les résultats de l'analyse élémentaire conduisent à une teneur en carbone de 42,32 p. 100 très voisine sans être identique rigoureusement au taux théorique de carbone du maltose soit 42,1.

Différentes études concernant le pouvoir rotatoire de l'amidon (α_D compris entre + 190° et + 210°) et de ses produits de dégradation ont permis d'établir que les unités glucoses sont liées dans l'amidon par des liaisons osidiques (1—4) de type α.

L'analyse conformationnelle montre que le glucose, en fonction de la nécessité de la disposition équatoriale des hydroxyles de la structure pyranosique (principe d'extension équatoriale de REEVES [65]) se trouve sous forme de bateau (schéma a — figure n° 1). Ceci assure la coliénarité des ponts oxydiques. L'axe du

bateau correspond à la ligne d'extension de la macromolécule (schéma b — figure n° 1).

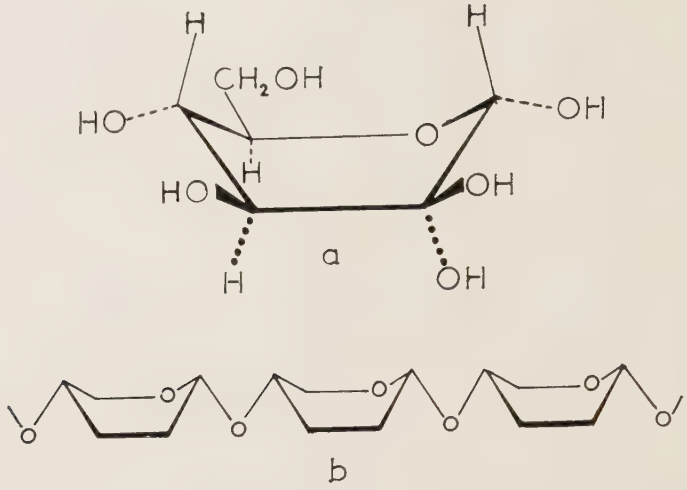

FIGURE N° 1 — a : forme bateau du glycopyranose ; b : enchaînement α (1—4) des unités glucopyranosiques dans l'amidon linéaire.

Ce mode d'enchaînement oppose deux à deux les hydrogènes voisins de chaque liaison osidique. La gêne stérique créée déforme la structure linéaire rectiligne vers une forme spiralée.

La disposition spatiale des unités glucosiques a été discutée par COOKE et KERRE (12). Les expériences de RUNDLE et BALDWIN (68), relatives à l'étude de la combinaison iode-amidon montrent que les axes principaux de l'atome d'iode et de la molécule d'amidon sont parallèles dans le complexe. RUNDLE et collaborateurs (69) indiquent que les formes cristallines de l'amylose ont une structure hélicoïdale alors que les formes granuleuses et rétrogradées présentent des chaînes étirées.

Quand l'amidon cristallisé réagit avec les vapeurs d'iode il apparaît un parallélisme ou une coïncidence entre les axes de l'iode et l'axe de l'hélice. Il semble que l'addition de l'iode à des solutions d'amylose conduit à un enroulement des chaînes autour des molécules d'iode d'où résulte le développement de la coloration bleue.

L'hypothèse d'une structure spiralée de l'amidon émise par HANES est étayée par les observations d'HARWORTH relativement au fait que 6 unités glucopyranosiques liées en 1—4 donnent une structure non tendue cyclique et symétrique. FREUDEMBERG (24) admet la présence des hydroxyles glucidiques dans une position externe de l'hélice ce qui permet d'expliquer la cristallisation de l'amylose dans le butanol.

La possibilité d'une structure hélicoïdale de l'amylose est admise par les auteurs anglo-saxons sans que le nombre exact d'unités participant à un tour de spire soit parfaitement précisé. Le nombre de six est considéré comme le plus probable.

Plus la chaîne est longue, plus le nombre de tours d'hélice croît, d'où une augmentation de la possibilité de combinaison entre l'iode et l'amylose. Ceci explique les modifications des colorations observées au cours des étapes de dégradation de la macromolécule par voies chimiques et enzymatiques.

La structure de l'amylopectine est beaucoup plus controversée et aucune preuve expérimentale n'est apportée pour résoudre ce problème. Les strutures proposées dérivent de celle du glycogène décrite par HAWORTH. Appliquées à l'amylose, elles conduisent à une hypothétique structure de base, linéaire, de 20 à 24 unités glucosiques. Ces unités s'associeraient par la fin réductrice de chacune d'elles sur une fonction alcoolique primaire occupant une position approximativement centrale d'une chaîne voisine (structure branchée par liaisons [1—6]).

Les données que nous venons de présenter ne considèrent que deux types de liaisons interglucidiques : (1—4) et (1—6). Elles ne permettent pas d'expliquer et d'interpréter correctement tous les résultats expérimentaux concernant les propriétés chimiques de l'amidon.

IV. — PROPRIETES CHIMIQUES DE L'AMIDON

Il est admis classiquement que l'amidon est un poly-α-glucopyranoside 1—4, certaines molécules sont linéaires, les autres branchées (liaisons 1—6). Il existe donc dans la molécule des groupements fonctionnels alcooliques libres secondaires (OH — 2, 3 et 5) et primaires (OH — 6). De même les chaînes doivent présenter des groupements terminaux non réducteurs (OH — 4) ainsi que des groupements pseudo-aldéhydiques libres réducteurs (OH — 1). Ces hydroxyles vont réagir pour donner des dérivés esters et éthers de l'amidon. Par ailleurs la macromolécule fragile subira une hydrolyse si les conditions opératoires sont énergiques.

A. — Ethérification de l'amidon : Méthylation

La méthylation de l'amidon constitue l'éthérification la plus utilisée. Elle est pratiquée selon la technique de HAWORTH, HIRST et WEBB (32), à partir de l'amidon acétylé, dissous dans l'acétone, sous l'action du sulfate de méthyle en milieu alcalin et à chaud. On obtient ainsi un "triméthylamidon". Le radical

méthoxy se fixe sur les hydroxyles alcooliques mais également sur les fonctions pseudo-aldéhydiques.

Par hydrolyse ménagée l'éther méthylique de l'amidon libère le méthanol fixé par liaison osidique (OH—1) ce qui permet à DUMAZERT et SENEQUIER (20) de doser les groupements pseudo-aldéhydiques libres du polyoside.

L'hydrolyse totale conduit à la libération de triméthyl 2, 3, 6 glucose, de tétraméthyl 2, 3, 4, 6 glucose et un diméthyl-glucose considéré généralement comme le diméthyl 2, 3 glucose. Le dérivé triméthylé correspond aux unités glucosiques entrant dans la constitution de la chaîne linéaire, le dérivé tétraméthylé a pour origine les unités terminales non réductrices des chaînes, le diméthyl-glucose provenant des unités portant les branchements interchaînes.

L'identification et le dosage des dérivés méthylés du glucose résultant de l'hydrolyse totale de l'amidon méthylé présentent un très grand intérêt. Il semble cependant qu'à l'heure actuelle les techniques utilisées n'ont pas un degré de précision suffisant pour conduire à des déterminations irréfutables. HIRST et collaborateurs (336) utilisent la séparation chromatographique de ces composés. Les produits isolés sont récupérés et dosés iodométriquement. BOURNE et collaborateurs (11) effectuent la séparation chromatographique sur colonne de silice (BELL, 7).

Ces techniques ont été discutées par KERR (43) qui conclut à l'extrême difficulté de méthyler totalement les hydroxyles libres, à la possibilité de dégrader d'une part l'amidon au cours de l'éthérification, et d'autre part les produits méthylés au cours de l'hydrolyse.

B. — **Estérification de l'amidon**

Les procédés d'estérification de l'amidon doivent être appliqués dans les conditions les plus douces possibles afin de ne pas altérer la macromolécule. REICH et DAMANSKY (66) proposent un procédé général d'estérification consistant à faire réagir le chlorure d'acide sur l'amidon au sein de la pyridine en milieu rigoureusement anhydre. Il se forme dans un premier temps un composé d'addition de la pyridine et du chlorure d'acide qui, ensuite, échange le groupement acyle contre un atome d'hydrogène d'un groupement oxhydryle du polyoside.

Les principaux esters de l'amidon qui ont été préparés sont :

— les esters acétiques, cinnamiques et benzoïques (66) qui ont permis la distinction de l'*amylogène* qui est considéré par REICH et DAMANSKY comme le constituant principal de l'amidon

naturel et de l'*amylon* obtenu par transformation de l'amylogène sous l'action de l'eau, des alcalis et des acides, avec apparition d'un oxhydryle estérifiable par unité de glucose.

— les esters de l'acide p-toluène sulfonique (tosylation) qui ont conduit HESS (35) à déterminer le nombre de groupements alcools primaires libres de l'amidon et DUMAZERT (14, 15) à mettre en évidence certaines différences entre les propriétés de l'amidon et du glycogène d'une part, et d'autre part d'éventuelles modifications apportées à la structure de l'amidon naturel sous l'action des alcalis.

— l'ester nicotinique de l'amidon (trinicotate d'amidon) qui présente une forme retard de la vitamine PP et qui est un des rares esters de l'amidon soluble dans l'éthanol (23).

— divers esters d'acides minéraux (esters phosphoriques [41, 42], nitrique et sulfurique [1]).

C. — **Acétolyse**

L'anhydride acétique ne peut agir sur l'amidon qu'en présence de catalyseur convenable. BOESEKEN et KERSTJENS (8) ont étudié en 1915 les vitesses d'acétylation de l'amidon en fonction de différents catalyseurs. PEISER (59) fait agir sur l'amidon sec l'anhydride acétique en présence d'acide sulfurique. PRINGHSEIM et MEYERSOHN (64) opèrent de même, mais en présence de 6 p. 100 d'eau. HAWORTH, HIRTS et WEBB (32) remplacent l'acide sulfurique par le chlore et l'anhydride sulfureux. Tous ces auteurs opèrent sur l'amidon naturel traité par de l'eau chaude.

PRINGHSEIM (60, 61, 62, 63) obtient par action de l'anhydride acétique en présence d'acide sulfurique un mélange de composés qu'il désigne sous le terme de nonacétate de trihexosane et d'hexacétate de dihexosane. Il conclut en faveur de l'hétérogénéité de l'amidon et considère l'amylopectine comme un polymère de dihexosane et l'amylose comme un polymère de trihexosane. SUTRA (74) confirme ces observations mais en tire une interprétation différente. L'acétolyse conduit bien à un mélange d'acétates mais il s'avère que l'acétylation provoque une dégradation importante de la macromolécule (acétolyse) : les produits décrits par PRINGHSEIM sont des mélanges d'acétates de différentes dextrines, les unes possédant un pouvoir réducteur, les autres en étant dépourvues. L'acétolyse a été également très utilisée pour l'étude de la cellulose (HESS et FRIESE [34]).

D. — **Oxydo-hydrolyse**

On désigne sous le terme d'oxydo-hydrolyse l'action des oxydants qui, en milieu alcalin, provoquent à la fois une hydrolyse

de la macromolécule et une oxydation des produits de dégradation. Différents procédés ont été décrits : HABERMANN (29) fait agir le brome et l'oxyde d'argent, LINTNER (50) oxyde l'amidon par le permanganate. HOENIG et RUZICKA (39) ont étudié l'oxydation de l'amidon par le brome en milieu alcalin et isolé l'acide maltobionique. DUMAZERT et LEHR (18) par action de l'hypobromite de sodium sur l'amidon isolent une substance blanche. Le fractionnement de ce produit brut leur permet d'obtenir l'acide maltosidogluconique.

E. — Oxydation

L'oxydation périodique de l'amylopectine et de l'amylose en milieu acide (MALAPRADE), porte sur les groupements α-glycols en libérant du formol. Par contre les unités glucosiques terminales constituant les extrémités non-réductrices des chaînes conduisent à la formation d'acide formique. Le dosage de cet acide permet donc d'apprécier la proportion qui existe entre les unités glucosiques terminales et les unités glucidiques des chaînes. Par ailleurs s'il existe dans la molécule d'amidon uniquement des unités glucopyranosiques liées en 1-4 et 1-6 elles doivent toutes être dégradées. Or, on retrouve environ 1 p. 100 de glucose non attaqué. ce qui laisse supposer qu'il existe dans l'amidon des liaisons dites "anormales" du type 1-2 ou 1-3. (37, 51).

V. — DEGRADATION ENZYMATIQUE DE L'AMIDON : LES AMYLASES

Les amylases sont des polyosidases, c'est-à-dire des enzymes qui dégradent les longues chaînes de l'amidon. Dans un mémoire récent SUTRA (76) écrit que « l'interprétation théorique que l'on donne aux faits expérimentaux observés par l'action des amylases sur l'amidon dépend de la conception que l'on se fait de la nature chimique de cette substance » (loc. cit.). LE CORVAISIER et SOLAUN (45) pouvaient dire en 1952 que « le problème des amylases reste lié à celui de l'amidon ».

Les amylases sont définies comme des enzymes à action purement hydrolytique consistant à rompre les liaisons (1-4) du type maltose ; la coupure s'effectue entre le carbone et le pont oxydique en libérant un groupe réducteur. On peut décrire trois actions des amylases sur l'amidon : une action liquéfiante, une aciton dextrinante et une action saccharifiante. L'action liquéfiante, générale pour toutes les amylases, a pour but de désagréger l'empois et de libérer les longues chaînes. Celles-ci sont dégradées à leur tour : la dextrinisation provoque la formation de produits intermédiaires (polysaccharides de pouvoir réducteur faible ou oligosaccharides de pouvoir réducteur élevé) et la saccharification conduit à des sucres fermentescibles.

La classification des amylases en deux groupes sous l'appellation d'α-amylases et de β-amylases est due initialement à KUHN (44). D'après cet auteur les alpha-amylases fournissent du maltose alpha et les béta-amylases du maltose béta. A la suite des travaux de OHLSSON on distingua les dextrinogènes-amylases qui donnent naissance à des quantités importantes de dextrines et les saccharogènes-amylases qui conduisent à du maltose responsable du pouvoir réducteur élevé apparu. A l'heure actuelle on définit les amylases de la manière suivante :

— *les α-amylases* ou *dextrinogène-amylases* ou encore *endoamylases,* répandues dans la plupart des tissus et des organes animaux ou végétaux rompent des liaisons à l'intérieur de la chaîne dans les intervalles entre les branchements.

— *les β-amylases* ou *saccharogène-amylases* ou *exoamylases,* que l'on rencontre surtout chez les végétaux supérieurs attaquent les chaînes à partir des extrémités non-réductrices.

Les β-amylases sont présentes dans la plupart des graines de graminées, dans la patate douce et le soja. Un certain nombre de β-amylases ont été isolées à l'état cristallisé (patate, blé, orge, pomme de terre, soja).

Elles sont hautement spécifiques et hydrolysent les liaisons 1-4 des chaînes de l'amidon jusqu'à ce que toute la chaîne soit convertie en disaccharides ou que l'enzyme approche une irrégularité de la chaîne (branchement). La β-amylase ne convertit que 70 à 85 p. 100 des "amyloses" en maltose. Il demeure une fraction résistante (dextrines limites). On tend à admettre à l'heure actuelle que cette fraction résistante est due à l'action de l'oxygène au cours des manipulations nécessaires à l'obtention de l'amidon et des amyloses. Cette action se traduirait à la fois par la formation de groupements qui sensibilisent les liaisons osidiques ainsi que par la formation de groupements terminaux anormaux qui ne permettent plus l'attaque de l'enzyme (6, 26).

Les α-amylases se rencontrent chez les animaux (salive, pancréas, sang, urine, muscle sperme), les végétaux, où elles apparaissent dans les graines à la germination pour disparaître lorsque la croissance est avancée (orge malté), et les micro-organismes (Aspergillus orizae [taka-diastase], Bacillus subtilis). Elles agissent tout d'abord en diminuant la viscosité de l'empois d'amidon et conduisent à l'apparition de sucres réducteurs. Des travaux récents mettant en œuvre les techniques de chromatographie pour la séparation des produits de dégradation de l'amylose par les α-amylases ont été publiés. DUBE et NORDIN (13) ont étudié l'action de l'α-amylase du sorgho, ils fractionnent les dextrines par chromatographie sur Sephadex et les oligosaccharides par chromatographie sur papier. WHELAN et ROBERTS (80) au cours d'un travail relatif à l'action de l'α-amylase de pomme de

terre sur l'amylose, montrent que cet enzyme conduit uniquement à du maltose et du maltosidoglucose comme termes ultimes de la dégradation de la chaîne polyosidique linéaire.

D'autres enzymes complètent l'action des amylases. Parmi eux signalons le *R-enzyme* qui scinde les liaisons 1-6, *l'amylo* (1-6) glucosidase qui hydrolyse l'amidon, le maltose et les maltosido-oligosaccharides en glucose.

VI. — STRUCTURE DE L'AMIDON

De nombreuses expériences montrent que l'amidon tend à se scinder en molécules comprenant 2 et 3 unités glucoses (maltose et maltosidoglucose). Par ailleurs DUMAZERT met en évidence de nombreux groupements pseudo-aldéhydiques libres dans le polyholoside. Ces propriétés ne peuvent être expliquées par les modèles classiques de structures (HAWORTH et son Ecole).

En tenant compte des résultats acquis par d'autres expérimentateurs et par lui-même et ses élèves DUMAZERT (16) propose un modèle de l'amidon présenté dans la figure n° 2.

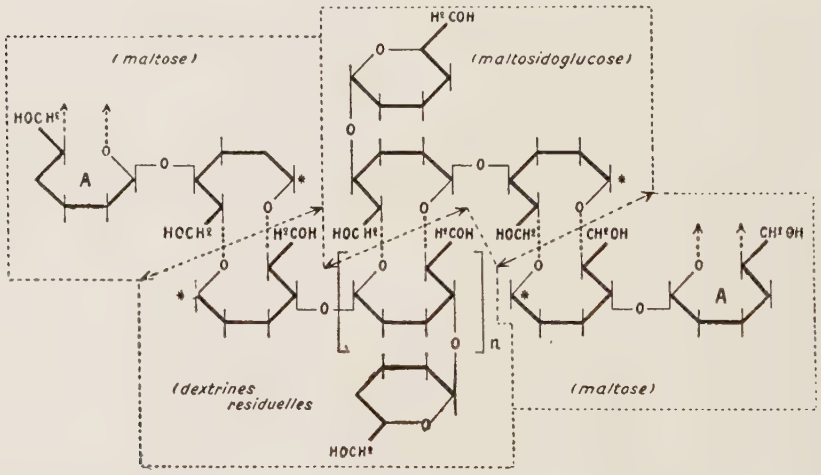

FIGURE N° 2 — Modèle de structure de l'amidon (C. DUMAZERT).

Ce schéma général traduit l'existence des liaisons osidiques 1-4 qui sont rompues avec hydratation. Ces liaisons unissent avec une fréquence particulièrement grande deux molécules de glucose sous forme de maltose, mais aussi trois molécules d'oses pour conduire à du maltosido-glucose. Un autre type de liaison est admis pour unir entre elles les diverses molécules. Ces liaisons, désignées sous le terme de liaisons semi-acétaliques croisées sont constituées par des ponts oxydiques entre les atomes de carbone 1 et 5 appartenant à deux unités fondamentales (liaisons 1-5' et

1'-5). La rupture de ces ponts s'effectue au cours de l'hydrolyse sans s'accompagner de fixation des éléments de l'eau à ce niveau.

La réaction d'hydrolyse par les acides se réalise par rupture des liaisons osidiques (1-4) et les éléments d'une molécule d'eau se fixent au niveau de la rupture. Lorsque les liaisons du type (1'-5 et 1-5') sont attaquées on peut admettre que leur scission s'effectue avec fixation de deux molécules d'eau pour donner naissance à deux restes glucosiques sous la forme d'hydrate d'aldéhyde. Mais on sait que cette dernière n'est pas stable et qu'immédiatement il y a formation des cycles pyraniques internes 1-5 et 1'-5'. Cela se produit avec élimination de deux molécules d'eau. Il en résulte que la rupture des liaisons (1-5') et (1'-5) s'est produite sans fixation d'eau à leur niveau. C'est ce que traduit l'équation ci-dessous :

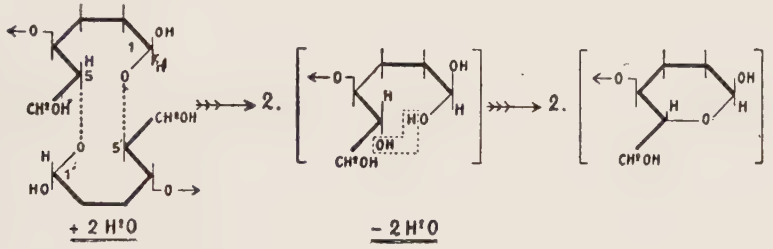

FIGURE N° 3 — Rupture des liaisons (1-5') et (1'-5) au cours de l'hydrolyse de l'amidon.

En effet l'hydrolyse complète de l'amidon ne saurait répondre à l'équation classiquement admise :

$$(C_6H_{11}O_5)_n + n\ H_2O \longrightarrow n\ C_6H_{12}O_6$$

Cette équation conduit à adopter la valeur de 0,900 pour le coefficient α par lequel on a coutume de multiplier la quantité de glucose dosée après hydrolyse complète pour la convertir en amidon. DUMAZERT a établi expérimentalement que le facteur de conversion α est égal à 0,945. Il est à noter que cette dernière valeur est très proche de $\alpha = 0{,}950$ laquelle découle théoriquement de l'équation ci-dessous :

$$(C_{12}H_{22}O_{11})_n + n\ H_2O \longrightarrow 2\ n\ C_6H_{12}O_6$$

Celle-ci sans être rigoureusement exacte traduit plus correctement la réaction d'hydrolyse de l'amidon.

Ce schéma traduit l'existence de nombreux groupements pseudo-aldéhydiques libres, groupements mis en évidence par l'étude des méthyl-éthers de l'amidon et qui sont portés par les carbones marqués d'un astérisque sur la figure n° 3.

Il s'accorde bien avec l'obtention de tri-esters et de tri-éthers de l'amidon, et même la possibilité de la formation de tétraméthylglycose isolé comme produit d'hydrolyse du polyholoside méthylé à fond. De même il permet d'exprimer la réaction d'oxydolyse de l'amidon en milieu alcalin. Sous l'action de l'oxydant (hypobromite) les fonctions pseudo-aldéhydiques libres sont transformées en groupements acides. De ce fait les carbones intéressés par cette réaction ont leurs valences saturées de telle sorte que les liaisons du type 1-5' ainsi que les cycles pyraniques ne peuvent plus exister. La rupture de ces liaisons supprime l'édifice moléculaire dont la destruction aboutit essentiellement à la formation des acides maltobionique et maltosidogluconique.

Le schéma proposé montre également que toutes les fonctions alcools primaires sont libres dans l'amidon naturel. Il ne semble pas qu'il en soit de même lorsque l'on substitue à l'amidon naturel l'amidon traité par la soude. En effet l'amidon présente une fonction primaire bloquée pour sept unités glucosiques. Le blocage de la fonction alcool primaire se traduit sur le schéma général en lui faisant subir une légère modification qui consiste à admettre la transposition d'un certain nombre de liaisons 1-5' en la position 1-6'. Cette transposition permet d'expliquer les modifications constatées à la suite de l'action de la soude sur l'amidon. Elle est admissible si l'on considère l'instabilité de ce type de liaison qui s'apparente à celui des liaisons oxydiques, pyraniques ou furaniques des oses. En effet, la transposition du pont oxydique interne des oses sous l'action des alcalis est un fait classiquement admis.

L'observation de l'amidon sous ses divers aspects a conduit à deux théories opposées : celle de l'amidon homogène et celle de l'amidon hétérogène. DUMAZERT pense pouvoir les concilier en considérant l'amidon comme une molécule extrêmement plastique au sein de laquelle se produisent avec la plus grande facilité les transpositions qui peuvent par ailleurs s'accompagner de multiples changements de contexture.

L'action des amylases pourrait s'expliquer comme n'étant pas autre chose que l'attaque des liaisons 1-5'. L'amylase amorcerait la rupture de celles-ci en respectant les liaisons osidiques (1-4). Dès qu'un nombre suffisant de liaisons 1-5' est rompu la cohésion de l'édifice moléculaire devient tellement précaire que les liaisons 1-5' restantes se rompent spontanément. Un tel mécanisme a l'avantage d'exprimer le fait bien connu de la spectaculaire évolution de l'amylolyse par l'α-amylase au cours de la phase initiale de son action. Les chaînons courts d'unités glucosidiques sont dégradés plus lentement dans une deuxième étape pour conduire à du maltose et du maltosidoglucose qui ne constituent pas des substrats pour cet enzyme (WHELAN et ROBERTS, 80).

OBJET DU TRAVAIL

PRINGSHEIM (60, 61, 62, 63) obtient par action de l'anhydride acétique en présence d'acide sulfurique un mélange de composés qu'il désigne sous les termes de non-acétate de trihexosane et d'hexacétate de dihexosane. Il conclut en l'hétérogénéité de l'amidon et considère l'amylopectine comme un polymère de dihexosane et l'amylose comme un polymère de trihexosane. SUTRA (74) confirme ces observations mais en tire une interprétation différente. Pour lui, si l'acétylation dans ces conditions opératoires conduit bien à un mélange de dérivés acétylés, il y a au cours de la réaction dégradation et hydrolyse partielle de l'amidon (acétolyse). Les produits décrits par PRINGSHEIM sont des mélanges de différentes dextrines acétylées, les unes possèdent un pouvoir réducteur, les autres en sont dépourvues.

Nous avons pensé qu'il serait intéressant de reprendre l'étude analytique des produits d'acétolyse de l'amidon au moyen des méthodes chromatographiques dont ne disposaient pas nos prédécesseurs. Dans ce but nous avons mis en œuvre la chromatographie en couches minces qui est particulièrement favorable à la séparation des composés polyacétylés comme DUMAZERT, GHIGLIONE et PUGNET (17) ont pu le montrer. Dans une deuxième étape nous avons procédé à une séparation des composés par chromatographie sur colonne à l'échelle semi-préparative. Pour cela nous avons mis au point un procédé correspondant à une transposition pratiquement directe de la chromatographie en couches minces utilisée pour l'analyse qualitative. Nous avons enfin déterminé les poids moléculaires des esters acétiques isolés à l'état pur dans le but de préciser les principaux produits de l'acétolyse de l'amidon.

C'est l'ensemble des techniques que nous avons mises en œuvre et des résultats obtenus que nous décrirons dans les différents chapitres de notre thèse.

RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE PREMIER

SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR "COUCHES MINCES" DE PRODUITS D'ACETOLYSE DE L'AMIDON

I. — Matériel et techniques

Nous avons disposé pour notre travail de trois types d'amidon : l'amidon naturel de blé, l'amidon soluble préparé selon DUMAZERT et SANTONI (19) et l'amidon acétylé obtenu selon les indications de REICH et DAMANSKY (66). Après avoir décrit les techniques d'obtention de l'amidon soluble et de l'amidon acétylé nous exposerons les procédés mis en œuvre pour réaliser leur acétolyse ainsi que la méthode chromatographique sur "couches minces" qui nous a permis de séparer les produits résultant de la dégradation estérifiante du polyholoside.

A. — PREPARATION DE L'AMIDON SOLUBLE ET DE L'AMIDON ACETYLE

1) *Préparation de l'amidon soluble de DUMAZERT et SANTONI*

La préparation de cet amidon soluble nécessite tout d'abord l'obtention de l'amidon soluble selon LEULIER (46).

a) **Amidon soluble selon LEULIER (46).** — On place dans un ballon de 500 ml de capacité 100 g d'alcool à 95°, 5 g d'acide sulfurique concentré (d = 1,83) et 25 g d'amidon de blé. On agite et on adapte au col du ballon un réfrigérant descendant. Le ballon est immergé dans un bain-marie. On porte la liqueur alcoolo-sulfurique à l'ébullition pendant 15 minutes. Au bout de ce temps on laisse la préparation se refroidir et on recueille l'amidon sur un filtre sans pli. On le lave à l'alcool à 95°, en prolongeant cette opération jusqu'à ce que le liquide filtré ne rougisse plus le papier de tournesol. On fait un dernier lavage à l'alcool et on sèche l'amidon sous vide.

b) **Amidon soluble de DUMAZERT et SANTONI.** — On met en suspension dans 50 ml d'eau distillée froide 10 g d'amidon soluble LEULIER. On chauffe au bain-marie jusqu'à obtention d'une solution colloïdale trouble. On laisse la préparation refroidir jusqu'à ce que la température soit voisine de 60°C. On ajoute alors 50 ml de lessive de soude à 40 %. En agitant on constate que la liqueur devient tout à fait limpide. Le liquide encore tiède est jeté dans 300 ml d'éthanol à 95°, il se produit un abondant précipité que l'on isole sur filtre Büchner en s'aidant d'une aspiration à la trompe à vide. Le produit se présente alors sous forme d'une masse pâteuse. On la met en contact avec une solution alcoolique normale de soude et on agite jusqu'à ce que le produit devienne pulvérulent. On lave ensuite rapidement à l'alcool.

La poudre obtenue est redissoute dans le minimum d'eau distillée froide. On ajoute à cette solution de l'acide acétique cristallisable jusqu'à réaction franchement acide au papier de tournesol, puis quatre volumes d'éthanol. On provoque la précipitation d'un corps que l'on isole sur filtre Büchner, qu'on lave abondamment à l'éthanol, puis au moyen d'éther sulfurique sec et enfin que l'on dessèche sous vide sur anhydride phosphorique.

2) *Préparation de l'acétyl-amidon selon REICH et DAMANSKY* (66)

On agite 7,5 g d'amidon naturel dans 120 ml de pyridine pure et sèche pendant 45 minutes pour disperser au maximum les grains de la substance dans la phase liquide. On ajoute alors peu à peu et en agitant 75 ml d'anhydride acétique. On bouche alors soigneusement le flacon dans lequel on a fait le mélange et on le porte dans un thermostat réglé à 75°C-80°C pendant 48 heures en agitant fréquemment. Après refroidissement on jette la préparation dans 1.000 ml d'eau glacée. On obtient un précipité que l'on isole par décantation puis qu'on lave abondamment et successivement par de l'eau distillée, de l'éthanol et de l'éther sulfurique sec. Le produit est entièrement soluble dans l'acétone et le chloroforme. On le purifie par dissolution dans l'acétone et reprécipitation dans un excès d'eau distillée glacée. Ce dérivé recueilli par filtration et lavé successivement par de l'eau distillée, de l'éthanol

et de l'éther sulfurique sec et séché sous vide sur anhydride phosphorique, correspond à un triacétate d'amidon (DUMAZERT, 20).

B. — ACETOLYSE DES AMIDONS

Nous avons conduit cette opération selon deux procédés : le premier préconisé par SUTRA (7), le second par HESS et FRIESE (34) :

1) *Acétolyse de l'amidon selon SUTRA* (74) : On place dans un erlenmeyer de 100 ml de capacité 40 ml d'anhydride acétique et 10 g d'amidon de blé. On agite une demi-heure. On verse lentement, en environ une demi-heure, 5 ml d'acide sulfurique concentré (d = 1.83) au moyen d'une burette. Le mélange est porté dans un bain d'eau que l'on chauffe graduellement jusqu'à ce que la température ait atteint 75°C. On sort alors la préparation du bain et on l'abandonne à la température du laboratoire pendant 2 heures. Au bout de ce temps la préparation est à nouveau immergée pendant une minute dans un bain-marie bouillant. On l'abandonne à nouveau pendant 3 heures à la température du laboratoire. Le mélange brunit fortement. On jette alors la solution dans 500 ml d'eau glacée. Il se forme un précipité qu'on laisse déposer pendant une nuit. Le produit est récupéré par décantation de la phase surnageante et est broyé au mortier sous eau en renouvelant la liqueur de lavage jusqu'à ce que la substance devienne pulvérulente. Le produit est alors essoré sur filtre Büchner et séché sous vide sur anhydride phosphorique.

2) *Acétolyse de l'amidon selon HESS et FRIESE* (34) : On mélange dans un flacon de 250 ml de capacité fermant à l'émeri, 75 ml d'acide acétique et 75 ml d'anhydride acétique. On refroidit à —10°C et on verse dans la liqueur 8 ml d'acide sulfurique concentré (d = 1,83). On introduit alors en cessant de refroidir, par petites portions et en agitant vigoureusement 20 g d'amidon. Le récipient est alors bouché hermétiquement et est abandonné 10 jours dans un thermostat réglé à 30°C. Au bout de ce temps la liqueur a pris une teinte acajou et est parfaitement limpide. On la verse, dans 1.000 ml d'eau glacée. Il se forme un précipité abondant qu'on laisse décanter pendant une nuit. On récupère la substance par décantation et on la broie sous eau dans un mortier jusqu'à ce qu'elle ait pris une consistance pulvérulente. On l'isole sur filtre Büchner et on l'essore soigneusement par aspiration à la trompe à vide. On sèche le produit sous vide sur anhydride phosphorique.

C. — ANALYSE DES PRODUITS D'ACETOLYSE PAR CHROMATOGRAPHIE SUR "COUCHES MINCES"

Nous décrirons la technique générale de la chromatographie "sur couches minces" comprenant la préparation du support, la

phase solvante, le développement du chromatogramme, les techniques de révélation mises en œuvre pour révéler sur le document les spots des esters acétiques des sucres et enfin le procédé d'enregistrement des chromatoplaques par opacimétrie directe.

1) *Préparation du support chromatographique :* Nous avons utilisé des plaques de verre à faces parallèles (glace) de 8 cm. 20 cm. L'absorbant choisi est le Kieselgel G d'après STAHL (Merk's Reagensien). La poudre, rapidement agitée avec le double de son poids d'eau distillée, fournit une suspension homogène qui est étalée sur les plaques de verre. Nous avons disposé de l'applicateur Desaga (Réf. 600). L'épaisseur du revêtement est de 0,3 mm.

La couche est abandonnée pendant 10 minutes à l'air. On dispose alors les plaques sur un support spécial et on les porte pendant 1 heure à l'étuve à 140°C. Au bout de ce temps elles sont retirées de l'étuve et déposées dans une enceinte close à l'abri des poussières.

2) *Solvant de migration :* Après de nombreux essais systématiques nous avons adopté le solvant de composition suivante :

Benzène : éthanol absolu (95 : 5 (v/v))

3) *Développement de la chromatographie :* On dépose à l'aide d'une microburette à piston (PROLABO) sur une ligne de départ située à 2 cm du bord inférieur de la plaque de 1 à 5 microlitres de solution alcoolique d'esters acétiques de glucides apportant environ 10 µg de chacun des composés que l'on désire séparer. On évapore le solvant au fur et à mesure du dépôt au moyen d'un léger courant d'air.

La plaque chargée est déposée verticalement dans une cuve de verre dont le fond est garni d'une couche de solvant de 1 cm d'épaisseur. On obture la cuve à l'aide d'une plaque de verre. On laisse le solvant migrer jusqu'à ce qu'il ait atteint une hauteur de 10 cm sur la plaque, ce qui nécessite un temps d'environ 30 minutes. On retire alors le chromatoplaque et on évapore le solvant de migration sous un courant d'air tiède. On effectue alors la révélation des esters acétiques par les méthodes que nous allons décrire.

4) *Révélation des esters acétiques de glucides :* Nous avons utilisé deux méthodes de révélation : la première est préconisée par DUMAZERT, GHIGLIONE et PUGNET (17) pour la révélation des esters acétiques de polyols et de glucides. Elle est fondée sur la réaction des esters acétiques avec l'hydroxylamine et le perchlorure de fer (22, 28). En milieu alcalin et à froid l'hydroxylamine hydrolyse rapidement les esters avec formation d'acide hydroxamique qui en présence d'ion ferrique et en milieu acide donne un complexe doué d'une intense coloration violette. La

seconde est une technique personnelle mettant en œuvre la classique réaction de MOLISH.

a) *Technique de DUMAZERT, GHIGLIONE et PUGNET.* —

On prépare tout d'abord le réactif suivant en mélangeant dans l'ordre des volumes égaux des trois liqueurs suivantes :

— solution à 12,5 g de chlorhydrate d'hydroxylamine dans 100 ml de méthanol ;

— solution à 12,5 g d'hydroxyde de sodium dans 100 ml de méthanol ;

— méthanol.

On élimine par filtration l'abondant précipité de chlorure de sodium formé. Le réactif est prêt à l'emploi mais il ne se conserve que 3 à 4 heures. On le pulvérise sur le chromatoplaque sec. On sèche la plaque sous un courant d'air pendant cinq minutes pour chasser le méthanol.

Dans un deuxième temps on pulvérise sur le chromatoplaque le réactif de formule suivante :

— solution de perchlorure de fer (d = 1,26)....	20 ml
— solution d'acide chlorhydrique concentré (d = 1,19)....	20 ml
— éthanol ..... q.s. p.	100 ml

Les spots correspondant aux esters acétiques apparaissent immédiatement en violet foncé sur un fond jaune.

b) *Révélation par la réaction de MOLISH.* — On pulvérise sur le chromatoplaque sec une solution de 1 g d'α-naphtol dans 100 ml d'éthanol. On évapore l'alcool sous un courant d'air pendant 5 minutes. On pulvérise alors une solution au 1/10e d'acide sulfurique concentré (d = 1,83) dans l'éthanol.

On porte la plaque à l'étuve chauffée à 50°C pendant 10 minutes. Les spots des esters acétiques des glucides apparaissent sous forme de taches mauves sur un fond légèrement rosé. On abandonne alors le chromatoplaque à la température du laboratoire pendant 30 minutes. Les spots deviennent alors d'une belle coloration bleue et la coloration de fond de la plaque disparaît. Les chromogènes formés au cours de cette réaction sont stables et permettent l'enregistrement du chromatogramme par photométrie directe.

5) *Enregistrement des chromatoplaques par photométrie directe selon GHIGLIONE, LEBOURHIS-SAUER et FONDARAI* (25) : Nous avons disposé de la technique et du matériel décrits par GHIGLIONE, LEBOURHIS-SAUER et FONDARAI (25). La position des spots des composés présents sur les chromatogrammes ainsi que l'intensité de l'absorption de leurs colorations sont enregistrées à l'aide de l'appareillage schématisé dans la figure n° 4 :

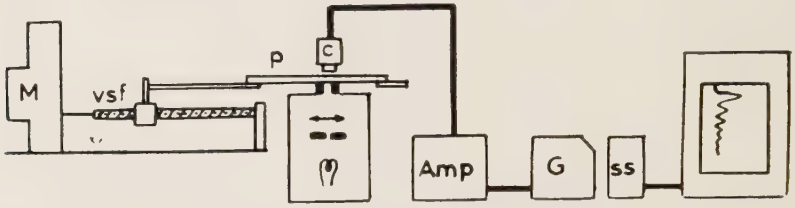

FIGURE N° 4 — Schéma du dispositif pour l'enregistrement par photométrie directe des chromatoplaques.

La plaque (p) est disposée sur un support métallique qui glisse sur deux rails. Ce support est entraîné par une vis sans fin (vsf) mue par un moteur (M). Le support et la plaque avancent ainsi de un cm par minute. La plaque défile devant une source lumineuse qui grâce à un collimateur permet d'obtenir un faisceau de 0,2 mm de large et de 1 cm de long. Au-dessus de la plaque se trouve une cellule photoélectrique (C) qui reçoit la lumière traversant le document. La réponse de la cellule est amplifiée (Amp) et est transmise à un galvanomètre muni d'un suiveur de spot (ss) lequel commande la plume d'un enregistreur dont le papier se déroule à la vitesse de un cm à la minute.

Le réglage de l'appareil est réalisé en déterminant d'une part une valeur correspondant à l'extinction totale de la cellule, c'est-à-dire à une réponse nulle et, d'autre part, une valeur correspondant à l'éclairement total. Le premier réglage est un réglage interne effectué à l'aide du dispositif de mise à zéro du galvanomètre ; quant au second il est réalisé en agissant sur un potentiomètre permettant de modifier l'intensité du faisceau lumineux qui traverse une surface de la plaque ayant subi l'action de l'agent de révélation mais qui ne comporte aucun composé détecté. Ces deux données se traduisent par deux points sur le papier de l'enregistreur. Une distance d'une dizaine de centimètres séparant ces deux points est parfaitement convenable.

Un calcul simple, que nous ne pouvons développer ici, permet d'exprimer les valeurs de l'intensité de l'absorption des spots colorés ainsi enregistrés en densité optique (90).

II. — Résultats expérimentaux

La mise en œuvre des techniques que nous venons de décrire nous a conduit aux résultats que nous allons exposer.

A. — ACETOLYSE DES AMIDONS ET DE L'ACETYLAMIDON

Quelles que soient la substance mise en œuvre et la technique d'acétolyse utilisée nous avons opéré sur 10 g de produit. L'amidon naturel de blé a été acétolysé par les méthodes de SUTRA (exp. A) et de HESS et FRISSE (exp. C). L'amidon acétylé (exp. B) et l'amidon de DUMAZERT et SANTONI (exp. D) ont été traités selon la technique de HESS et FRIESE.

Dans chaque cas nous avons déterminé la quantité de produits bruts résultant de l'acétolyse de 10 g d'amidon. Les résultats sont exprimés dans le tableau n° 1.

TABLEAU N° 1

Rendement des opérations d'acétolyse (en g de produits acétylés recueillis pour 10 g de produit mis en œuvre)

Exp. n°	Procédé d'acétolyse	Quantité de produit acétylé recueilli (en g. pour 10 g.)
A	SUTRA	4,2
B	HESS et FRIESE	10,8
C	HESS et FRIESE	16,0
D	HESS et FRIESE	15,9

Les équations générales de ces réactions sont les suivantes :

— en ce qui concerne l'acétolyse des amidons :

$$(C_{12}H_{22}O_{11})_n + 8n\,(CH_3CO)_2O \longrightarrow n\,(C_{12}H_{14}O_{11})\,(CH_3{-}CO)_8 + 8\,n\,CH_3COOH$$

$$(342)_n \longrightarrow n\ 678$$

$$10\ g \longrightarrow 19{,}82\ g$$

— en ce qui concerne l'acétolyse de l'amidon acétylé :

$$(C_{12}H_{16}O_{11})\,(CH_3CO)_{6\ n} + 2n\,(CH_3CO)_2O \longrightarrow n\,(C_{12}H_{14}O_{11})\,(CH_3CO)_8 + 2nCH_3COOH$$

$$(594)_n \longrightarrow n\ 678$$

$$10\ g \longrightarrow 11{,}41\ g$$

A l'examen des données rassemblées dans le tableau n° 1 on note que l'acétolyse de l'amidon naturel par la technique de SUTRA (74) conduit à un rendement faible (4,5 g pour 10 g). Par contre, le procédé de HESS et FRIESE (34) permet d'obtenir une plus grande quantité de dérivés acétylés pour un même poids de

polyholoside (16 g pour 10 g) (R % = 80). L'acétolyse de l'amidon acétylé conduit également à un rendement très convenable par rapport à l'équation théorique (R % = 86).

B. — SEPARATION DES ESTERS ACETIQUES DE GLUCIDES RESULTANT DE L'ACETOLYSE DE L'AMIDON PAR CHROMATOGRAPHIE SUR "COUCHES MINCES"

Les différents diagrammes d'enregistrement des chromatoplaques résultant de la séparation par chromatographie en couches minces des produits d'acétolyse que nous avons préparés sont rassemblés dans le graphique de la figure n° 5.

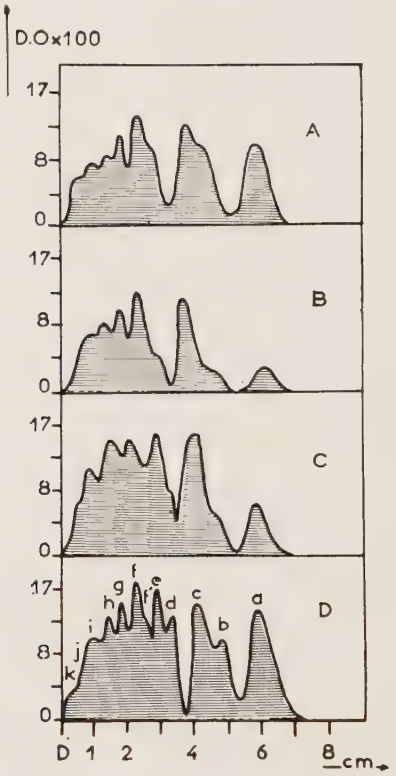

FIGURE N° 5 — Schéma de l'enregistrement par opacimétrie directe des chromatoplaques résultant de la séparation chromatographique en couches minces des produits d'acétolyse suivants :

A - Amidon naturel de blé, acétolysé selon SUTRA (74).

B - Amidon acétylé (66) acétolysé selon HESS et FRIESE (64).

C - Amidon naturel de blé acétolysé selon HESS et FRIESE.

D - Amidon soluble (19) acétolysé selon HESS et FRIESE (34).

L'examen des schémas contenus dans la figure n° 5 correspondant à l'enregistrement des chromatographies sur couches minces des produits d'acétolyse obtenus montre que l'on peut mettre en évidence, dans tous les cas, 12 constituants. Nous désignons les différents esters respectivement par : a, b, c, d, e, f', f, g, h, i, j et k (ce dernier constituant (k), présent uniquement dans l'essai D, n'étant pas parfaitement établi).

Les proportions relatives de ces divers composés varient selon le procédé d'acétolyse et la nature de l'amidon mis en œuvre sans qu'il soit possible en l'état actuel de nos connaissances de tirer des conclusions sur la structure des amidons et sur le rôle de la méthode d'acétolyse dans le processus de dégradation.

C. — IDENTIFICATION DES COMPOSES a ET c PAR CHROMATOGRAPHIE SUR "COUCHES MINCES"

Parmi les composés que l'on peut prévoir comme constituants des produits d'acétolyse des amidons, nous ne disposons que de deux substances de référence : le penta-acétyl glucose et l'octa-acétylmaltose préparés à partir des glucides correspondants par la méthode de WICKBERG (82).

Dans les conditions opératoires qui viennent d'être décrites nous avons observé que les Rf de ces deux substances étaient identiques respectivement à ceux des composés a et c présents dans les produits d'acétolyse. Des expériences de surcharge nous ont permis de confirmer cette identification.

De l'ensemble des résultats contenus dans cette première partie de notre travail il ressort que la chromatographie en couches minces nous a permis de mettre en évidence 12 composés dans les produits bruts résultant de l'acétolyse de divers amidons. Parmi ces composés nous avons identifié le penta-acétyl-glucose et l'octa-acétyl-maltose.

CHAPITRE II

SEPARATION DES PRODUITS D'ACETOLYSE DE L'AMIDON PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

Afin de disposer de quantités appréciables des différents constituants formés au cours de l'acétolyse de l'amidon, nous avons procédé au fractionnement par séparation chromatographique sur colonne.

Pour cela nous avons utilisé une technique consistant à transposer la technique de chromatographie en couches minces. Les considérations théoriques et les données expérimentales de la chromatographie en couches minces (31) laissent prévoir qu'il s'établit le long du support un gradient de concentration du solvant le plus polaire lorsque l'on utilise une phase mobile binaire. Nous avons mis au point la séparation des esters acétiques des glucosides par chromatographie sur colonne en choisissant comme phase stationnaire la phase utilisée en chromatographie en couches minces soit le Kieselgel G ; la phase mobile étant constituée de benzène variant graduellement en concentration en éthanol.

Il était nécessaire de disposer d'une méthode analytique nous permettant de repérer dans les effluents les esters acétiques. Pour cela nous avons fait appel à un procédé colorimétrique de dosage des esters acétiques basé sur la réaction hydroxylamine-perchlorure de fer. Nous avons adopté la technique décrite par VINCENT (78).

Nous exposerons dans ce chapitre d'une part l'ensemble des techniques que nous avons utilisées, et d'autre part les résultats auxquels elles nous ont permis d'aboutir.

I. — Matériel et techniques

A. — TECHNIQUE CHROMATOGRAPHIQUE

Les différents problèmes que nous avions à résoudre étaient relatifs au choix de la phase stationnaire et au dispositif permet-

tant d'obtenir l'admission sur la colonne d'un solvant variant graduellement et automatiquement dans sa composition. Après de nombreux essais nous avons adopté le dispositif présenté sous forme de schéma dans la figure n° 6 :

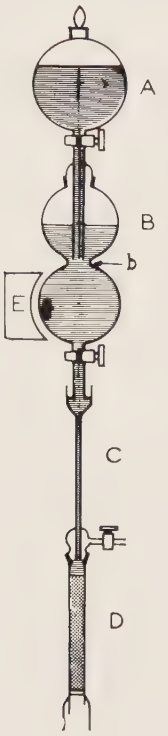

FIGURE N° 6 - Schéma du dispositif de chromatographie sur colonne A : ampoule réservoir contenant le solvant : benzène-éthanol (95 : 5) (v/v) - B : ampoule réservoir contenant le solvant benzène-éthanol (99,5 : 0,5) (v/v) - C : tube d'alimentation à niveau constant - D : colonne à chromatographie - E : agitateur magnétique.

Le dispositif que nous avons utilisé et qui est représenté schématiquement dans la figure n° 6 comprend deux parties : la première est la colonne à chromatographie proprement dite munie d'un tube d'alimentation assurant une hauteur constante de solvant au-dessus de la phase fixe, ce qui conduit à un débit fixe en fonction du temps ; la seconde est un système permettant la création d'un gradient de concentration de la phase mobile inspiré de celui décrit par HAUTON (30).

— La colonne à chromatographie est un tube de verre de 20 cm de long et de 10 mm de diamètre (D) muni à sa partie inférieure d'un verre fritté et d'un dispositif de protection contre l'évaporation du solvant. Au sommet du tube est soudée la partie femelle d'un rodage. Le tube d'alimentation C est un tube de verre de 20 cm de haut et de 3 mm de diamètre. Une ampoule est

fixée à sa partie inférieure. L'ampoule se termine par un rodage mâle qui permet d'adapter le tube d'alimentation à la colonne. Un ajutage latéral, muni d'un robinet, est placé sur cette ampoule. La partie supérieure du tube C est constituée par un entonnoir cylindrique de 5 cm de haut et de 3 cm de large.

— Le système d'alimentation est constitué de deux réservoirs.

Le réservoir inférieur B comprend deux ampoules sphériques de 200 ml de capacité communiquant en *b*. Le réservoir se termine inférieurement par un tube de verre de large diamètre (10 mm) et d'un robinet dont le boisseau est percé d'un canal de 3 mm de diamètre. On adapte au sommet de ce réservoir, à l'aide d'un rodage, une ampoule à brome A de 250 ml de capacité. Le tube d'écoulement de cette ampoule a une longueur telle qu'il atteint le niveau de l'étranglement *b* du réservoir B. L'ampoule A est munie d'un robinet à sa partie inférieure et d'un bouchon rodé à son sommet.

Une opération chromatographique comprend deux temps consistant à préparer la colonne et à remplir le système d'alimentation en solvant.

— Le Kieselgel G (Merk) est traité par une quantité convenable d'eau puis séché et activé à 140°C pendant une heure (voir p. 38). La poudre est mise en suspension dans une liqueur constituée de benzène et d'éthanol (99,5 : 0,5) (v/v). On verse la suspension dans la colonne. On attend que la phase solide ait sédimenté et occupe une hauteur de 18 cm dans la colonne. Lorsque le solvant ne recouvre plus le gel que sur une hauteur de 1 cm on place la prise d'essai au sommet de la colonne. On adapte alors le tube d'alimentation C. On remplit celui-ci de solvant. La manœuvre du robinet latéral permet de remplir le tube et de fixer le niveau du solvant dans l'entonnoir supérieur.

— On place dans le réservoir A, 200 ml d'une solution d'éthanol dans le benzène (97 : 3) (v/v) et dans le réservoir B un mélange benzène-éthanol (99,5 : 0,5) (v/v). L'ordre le plus rationnel des manipulations est le suivant : remplissage du réservoir supérieur A, fermeture de celui-ci au moyen du bouchon rodé, création d'un vide partiel à la bouche par l'intermédiaire du tube d'écoulement, remplissage du réservoir inférieur B, solidarisation hermétique des deux réservoirs par le rodage de jonction, création d'un vide partiel dans le réservoir inférieur comme précédemment après avoir retourné l'ensemble du système.

Le dispositif est placé sur l'entonnoir du tube d'alimentation de telle manière que la partie inférieure du tube d'écoulement du réservoir B affleure le niveau du liquide. Les robinets des réservoirs sont alors ouverts avec précaution.

Le fonctionnement de l'ensemble peut se décrire ainsi : une baisse du niveau du liquide dans le tube d'alimentation consécutive à l'écoulement de la phase mobile à travers la colonne provoque une entrée d'air dans le réservoir inférieur B. Ceci a pour effet d'entraîner l'écoulement du liquide B. Lorsque le niveau du liquide dans l'ampoule B est inférieur à celui du tube d'écoulement de l'ampoule A de l'air entre dans cette ampoule et chasse une quantité de liquide permettant de rattraper le niveau b. Le liquide contenu en A étant plus riche en éthanol que celui de B le solvant admis au sommet de la colonne est de plus en plus polaire.

De la conservation des équilibres résultent des niveaux constants, un débit régulier d'écoulement de l'effluent de la colonne et une variation graduelle et automatique de la concentration en éthanol du solvant de chromatographie.

L'homogénéisation des liquides dans l'ampoule B est améliorée par la mise en œuvre d'un agitateur magnétique E.

L'effluent de la colonne est recueilli par fractions de 3 ml dans un temps de 30 minutes. L'analyse nécessite la collection de 125 fractions soit une durée totale de l'opération égale à 63 heures.

Les différentes fractions recueillies dans des tubes à essai sont évaporées "in situ" dans une étuve bien ventilée, réglée à 60° C.

Les résidus sont redissous dans 4 ml d'éthanol pour les fractions portant les n^{os} 1 à 75 et dans 2 ml d'éthanol pour les fractions portant les n^{os} 76 à 125. Le dosage des groupements acétyls a été effectué sur des prises d'essais de 1 ml, par la méthode colorimétrique que nous allons décrire. Les résultats sont calculés en D.O. pour la totalité des fractions recueillies.

B. — DOSAGE DES GROUPEMENTS ACETYLS DES ESTERS PRESENTS DANS L'EFFLUENT

Nous avons choisi une technique colorimétrique. Cette réaction décrite pour la première fois par FLEIG, ANGER et FREHDEN (22) est basée sur le fait que l'hydroxylamine en milieu alcalin hydrolyse à froid et d'une manière pratiquement instantanée la fonction ester en donnant lieu à la formation d'un acide hydroxamique selon l'équation :

$$R—CO—O—R' + HO—NH_2 \longrightarrow R—CO—NH—OH + R'OH$$

En milieu acide l'acide hydroxamique forme avec le chlorure ferrique un complexe coloré.

Nous avons adopté le mode opératoire décrit par VINCENT (78) qui nécessite les réactifs suivants :

a) *Réactif à l'hydroxylamine :* on dispose de deux solutions ; la première est une solution aqueuse de 14 g de chlorhydrate d'hydroxylamine pour 100 ml de liqueur, la seconde est une solution 0,35 N de soude. On mélange au moment de l'emploi un volume de la solution d'hydroxylamine et deux volumes de solution alcaline ;

b) Solution 4 N d'acide chlorhydrique ;

c) Solution 0,37 N de chlorure ferrique dans une solution 0,1 N d'acide chlorhydrique ;

d) Solution à 50 p. 100 (v/v) d'éthanol dans l'eau distillée.

A un ml de solution alcoolique de composé acétylé apportant de 20 à 300 µg de groupements acétyls (Ac : $CH_3COO—$ = 59) on ajoute 0,4 ml de solution alcaline d'hydroxylamine (a). Après avoir homogénéisé par agitation, on ajoute 0,3 ml de solution 4 N d'acide chlorhydrique (b) et 0,2 ml de solution chlorhydrique de chlorure ferrique (c) puis 5 ml d'éthanol à 50 p. 100. Il se développe une coloration violette dont l'intensité demeure constante de 20 minutes à 60 minutes. On détermine au bout de 30 minutes l'intensité de l'absorption de la coloration au spectrophotomètre sous une épaisseur de 10 mm et pour une longueur d'onde de 520 mµ.

L'intensité de la coloration est lue contre un essai témoin réalisé dans les mêmes conditions que précédemment mais au cours duquel on a remplacé la prise d'essai par 1 ml d'éthanol absolu.

Nous avons établi une courbe d'étalonnage de cette méthode à partir de quatre substances de référence :

L : octacétyl-lactose (P.M. = 678 ; 50,7 % d'Ac.)
S : octacétyl-saccharose (P.M. = 678 ; 50,7 % d'Ac.)
M : octacétyl-maltose (P.M. = 678 ; 50,7 % d'Ac.)
G : pentacétyl-glucose (P.M. = 390 ; 55 % d'Ac.)

Nous avons préparé le pentacétyl-glucose, l'octacétyl-lactose et l'octacétyl-maltose par la méthode de WICKBERG (82) et l'octacétyl-saccharose par le procédé de LINSTEAD et collaborateurs

Nous présentons dans la figure n° 7 le graphique d'étalonnage de la méthode en portant en ordonnées les densités optiques et en abscisses les quantités correspondantes d'acétyls (Ac = 59) apportées par des quantités connues d'esters glucidiques.

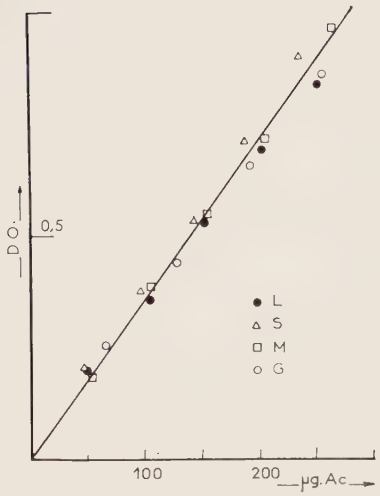

FIGURE N° 7 — Courbe d'étalonnage du dosage colorimétrique des esters acétiques des glucides par la méthode de VINCENT (78) (L = octacétyl-lactose ; S : octacétyl-saccharose ; M : octacétyl-maltose ; G : pentacétyl-glucose).

L'examen du graphique contenu dans la figure n° 7 montre que la courbe d'étalonnage est une droite. La quantité de radicaux acétyls des divers esters de glucides peut être déterminée avec une erreur inférieure à + 5 p. 100 pour des valeurs comprises entre 50 et 200 µg. Ce résultat montre que les déterminations sont valables quelle que soit la nature de l'ose acétylé.

II. — Résultats expérimentaux

Nous donnons à titre d'exemple dans la figure n° 8 un graphique correspondant à la séparation des dérivés résultant de l'acétolyse de l'amidon soluble de DUMAZERT et SANTONI (19), selon HESS et FRIESE (34). Les effluents ont été analysés par détermination des groupements acétyls selon la technique que nous venons de décrire.

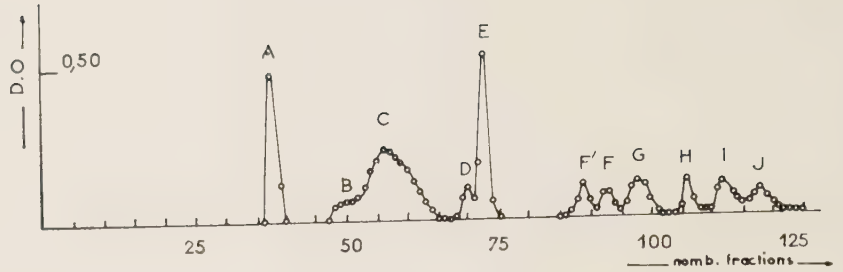

FIGURE N° 8 — Schéma du chromatogramme relatif à la séparation des esters de glucides présents dans les produits d'acétolyse de l'amidon soluble de DUMAZERT et SANTONI (19) par la méthode de HESS et FRIESE (34). (Kieselgel : 2,5 g ; réservoir B : 220 ml de solvant benzène-éthanol (99,5 : 0,5) (v/v) ; ampoule A : 250 ml de solvant benzène-éthanol (97 : 3) (v/v) ; fraction : 3 ml en 30 minutes) (en abscisses : D.O. — en ordonnées : n° des fractions).

L'examen du graphique contenu dans la figure n° 8 montre que la séparation effectuée par chromatographie sur colonne recoupe ceux obtenus par chromatographie sur couches minces. Nous mettons en évidence par cette technique onze composés que nous désignons par les lettres : A, B, C, D, E, F', F, G, H, I et J.

Des volumes convenables des solutions alcooliques des différentes fractions recueillies ont été soumis à la chromatographie en couches minces selon les indications décrites au chapitre n° 1 (voir p. 37). En comparant les Rf des différents spots obtenus et ceux des composés acétylés présents dans le produit brut nous avons observé que les onze composés séparés en chromatographie sur colonne sont respectivement les esters a, b, c, d, e, f', f, g, h, i et j, mis en évidence par chromatographie en couches minces.

Nous ne retrouvons pas ici le constituant k, ce qui nous laisse supposer qu'il correspond bien à un artefact apparu au lieu de dépôt de l'échantillon.

CHAPITRE III

DETERMINATION DES POIDS MOLECULAIRES D'ESTERS ACETIQUES PROVENANT DE L'ACETOLYSE DE L'AMIDON

Les résultats que nous avons obtenus montrent que nous avons séparé par chromatographie sur colonne la plupart des dérivés mis en évidence par chromatographie en couches minces.

Cette dernière méthode nous a permis d'apprécier la pureté des différentes fractions séparées. Nous avons rassemblé les liqueurs constituées par les solutions d'un même composé. Après avoir répété quatre fois la séparation chromatographique nous avons disposé d'environ 25 à 50 mg des composés A, C, E, F, G et J. Nous avons déterminé les poids moléculaires de ceux-ci par microcryoscopie selon RAST.

Les autres composés n'ont pas été étudiés car nous n'en avons recueilli que de trop faibles quantités à l'état chromatographiquement pur.

I. — TECHNIQUE

Nous avons utilisé la microméthode de RAST selon les indications de STEYERMARK (73). Le camphre a été choisi comme solvant. Nous disposions d'un échantillon présentant un point de fusion Pf = 179,4° et dont la constante de dépression avait pour valeur K = 40.

Nous avons utilisé l'appareillage de TOTTOLI (W. BUCHI, Glasapparatefabrik Flawil/Schwelz). Les déterminations ont été effectuées sur des prises d'essais exactement pesées de 1 à 2 mg d'ester acétique et de 15 à 25 mg de camphre. Les substances ont été pesées au 1/100e de mmg.

La précision de la méthode permet de connaître les poids moléculaires avec une erreur inférieure à ± 5 p. 100. Nous avons

effectué cinq déterminations pour chaque composé et établi la moyenne arithmétique. Nos résultats sont rassemblés dans le tableau n° 2.

TABLEAU N° 2

Détermination des poids moléculaires des six composés isolés à l'état pur à partir des produits d'acétolyse de l'amidon

Substance	P.M.	Formule théorique correspondante : X	P.M. X
A	380	V — Ac*-glucose	390
C	670	VIII — Ac-maltose	678
E	550	VI — Ac-maltose	557
F	965	XI — Ac-malt**-glucose	966
—	—	XIV — Ac-malt-maltose	1254
G	1400	—	—
—	—	XVII — Ac-malt-malt-glucose	1524
J	1600	—	—
—	—	XX — Ac-malt-malt-maltose	1800

* Ac = Acétyl.

** malt = Maltosido.

De l'examen des résultats contenus dans le tableau n° 2 il ressort que nous avons déterminé les poids moléculaires de six composés isolés à partir des produits d'acétolyse de l'amidon. Parmi ceux-ci quatre peuvent être identifiés : A, C, E et F, respectivement au pentacétyl-glucose, à l'octacétyl-maltose, à l'hexacétyl-maltose et à l'undécacétyl-maltosido-glucose. On peut raisonnablement admettre que les composés H et C sont des esters non totalement acétylés de polyglucosides composés de 5 et 6 unités glucoses : le maltosido-maltosido-glucose et le maltosido-maltosido-maltose.

Les formules des composés A, C, E et F ayant été admises, nous avons pu calculer la quantité de ces composés présents dans le produit brut de l'acétolyse en fonction de la courbe d'étalonnage de la technique colorimétrique selon VINCENT, et des résultats obtenus lors de l'analyse des fractions de résultants de la séparation chromatographique sur colonne de quantités connues de produit d'acétolyse. C'est ainsi que nous avons pu déterminer les pourcentages approximatifs des quatre composés qui sont les suivants :

pentacétyl-glucose	7 p. 100
octacétyl-maltose	45 p. 100
hexacétyl-maltose	7 p. 100
undecacétyl-maltosido-glucose ...	5 p. 100

Ces données montrent bien l'importance de la structure maltose dans l'amidon car ce sont les produits acétylés de celui-ci qui constituent la majeure partie des esters acétiques de glucides obtenus après acétolyse du polysaccharide.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Arrivé au terme de notre travail il nous faut maintenant en tirer les principales conclusions.

Nous avons, tout d'abord, au cours d'un bref exposé bibliographique, rassemblé des données relatives aux propriétés chimiques de l'amidon et aux considérations théoriques en rapport avec sa structure. Nous avons, en ce sens, insisté sur le modèle structural proposé par C. DUMAZERT. Celui-ci traduit l'existence de liaisons glucosidiques (1-4) qui unissent avec une fréquence particulièrement grande deux molécules de glucose sous forme de maltose et trois molécules d'ose pour conduire à du maltosido-glucose. Cet auteur admet à côté de cette liaison classique un autre type constitué par des ponts oxydiques entre les atomes de carbone 1 et 5 appartenant à deux unités fondamentales maltosique et maltosido-glucosique.

Nous nous sommes proposé au cours de notre travail d'étudier les produits résultant de l'acétolyse de l'amidon. On trouvera dans notre thèse la description des techniques chromatographiques que nous avons utilisées dans ce but.

1° Dans une première étape nous avons mis en œuvre, sur le plan qualitatif, la chromatographie en couches minces (CCM). Cette technique est aujourd'hui classique. Nous avons utilisé comme support le Kieselgel G et comme solvant un mélange de benzène et d'éthanol. Nous avons décrit une technique originale de révélation des esters acétiques des glucides présents sur les chromatoplaques fondée sur la réaction de MOLISCH. Nous avons pu ainsi obtenir des documents montrant la complexité des produits d'acétolyse de l'amidon qui se sont avérés contenir onze constituants quelle que soit la nature de l'amidon mis en œuvre et la technique d'acétolyse utilisée.

2° Au cours d'une deuxième partie de notre travail, nous avons mis au point une méthode de séparation semi-préparative de ces composés par chromatographie sur colonne sur gel de silice (Kieselgel H pour CCM). Nous avons utilisé un appareillage simple permettant d'effectuer l'analyse au moyen d'un solvant constitué de benzène variant graduellement en concentration en éthanol.

L'analyse des effluents a été réalisée, sur des fractions aliquotes, au moyen d'une technique colorimétrique fondée sur la formation d'un complexe coloré du fer avec les acides hydroxamiques provenant de l'hydroxylaminolyse des esters acétiques. Les résultats enregistrés par cette technique confirment ceux précédemment obtenus. Elle nous a permis en outre d'isoler à l'état pur six composés que nous désignons par les lettres A, C, E, F, G et J.

3° La détermination des poids moléculaires de ces esters par microcryométrie selon RAST nous a conduit à identifier les corps A, C, E et F respectivement au pentacétyl-glucose, à l'octacétyl-maltose, à l'hexacétyl-maltose et à l'undecacétyl-maltosido-glucose. Les composés G et J de poids moléculaires plus élevés n'ont pas été identifiés.

En résumé, nous avons montré que l'acétolyse de l'amidon conduisait à un produit constitué d'un mélange d'esters acétiques comprenant au moins onze dérivés différents. Nous avons pour cela utilisé d'une part la chromatographie en couches minces et la chromatographie sur colonne des esters acétiques de glucides

Parmi les esters mis en évidence nous avons pu isoler quatre substances à l'état pur que nous avons identifiées respectivement au pentacétyl-glucose, à l'octacétyl-maltose, à l'hexacétyl-maltose et à l'undecacétyl-maltosido-glucose. Les proportions de ces esters dans le produit brut provenant de l'acétolyse de l'amidon soluble de DUMAZERT et SANTONI sont de 7,45, 7 et 5 p. 100. Ces résultats montrent l'importance de l'enchaînement maltose dans la structure de l'amidon puisque plus de la moitié des dérivés acétylés sont constitués par des esters de ce diose. L'isolement d'un composé correspondant à l'hexacétylmaltose peut être interprété soit comme un défaut, bien improbable vu les conditions opératoires, de l'acétylation, soit par la présence dans la molécule d'amidon d'un type particulier de liaison.

On notera également la faible proportion de dérivé acétylé du glucose et du maltosido-glucose ; ceci laisse à penser que les unités fondamentales, mono-, di-, tri- ou poly-osidiques sont unies dans la macromolécule par des liaisons moins stables que la liaison glucosique 1-4, en accord avec le modèle de l'amidon proposé par C. DUMAZERT.

LU et APPROUVE :
Le Président du Jury :
Professeur J.-C. DUMAZERT.

VU et APPROUVE :
Pour le Doyen,
l'Assesseur :
Professeur L. VIGNOLI.

VU et PERMIS D'IMPRIMER :
AIX-EN-PROVENCE le 11 juillet 1966
Le Recteur : C. FRANCK.

BIBLIOGRAPHIE

1. ARDISSONE (J.P.). — Thèse Pharmacie Marseille, 1963.
2. ASHFORD (W.R.), EVANS (T.H.) et HOBBERT (H.). — *Canad. J. Res.* B 24, 1946, 246.
3. BAKER (J.L.). K *J. Chem. Soc.* 1902, *81,* 1177.
4. BALDWIN (M.E.). — *J. Amer. Chem. Soc.* 1930, *52,* 2907.
5. BATES (F.L.), FRENCH (D.) et RUNDLE (R.E.). — *J. Amer. Chem. Soc.* 1943, *65,* 142.
6. BAUM (H.), GILBERT (G.A.) et SCOTT (N.D.). — *Nature,* 1956, *177,* 889.
7. BELL (D.J.). — *J. Chem. Soc.* 1944, *473.*
8. BOESEKEN (J.), VAN DER BERG (J.C.) et KERSTJENS (H.). — *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas,* 1915, *35,* 320.
9. BOURNE (E.J.), DONNISON (G.M.), HAWORTH (W.N.) et PEAT (S.). *J. Chem. Soc. 1948, 1687.*
10. BOURNE (E.J.), DONNISON (G.H.) PEAT (S) et WHELAN (W.J.). — *J. Chem. Soc.* 1949, *1.*
11. BOURNE (E.J.), FANTES (K.H.) et PEAT (S.). — *J. Chem. Soc.* 1949, *1109.*
12. COOKE (L.M.) et KEER (R.W.). — Chemistry and Industry of Starch. N.Y. 1944. Chap. XVII.
13. DUBE (S.K.) et NORDIN (P.). — *Arch. Biochem. Biophys.* 1962, *99,* 105.
14. DUMAZERT (C.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1950, *32,* 983.
15. DUMAZERT (C.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1950, *32,* 988.
16. DUMAZERT (C.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1950, *32,* 898.
17. DUMAZERT (C.), GHIGLIONE (C.) et PUGNET (T.). — *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1963, *475.*
18. DUMAZERT (C.) et LEHR (H.). — *Soc. Chim. Biol.* 1941, *23,* 1289.
19. DUMAZERT (C.) et SANTONI (G.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1940, *22,* 369.
20. DUMAZERT (C.) et SENEQUIER (R.) — *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1948, *20,* 213.
21. EFFRONT (J.). — *Ann. Soc. Zymologie* 1930, *2,* 5.
22. FEIGL (F.), ANGER (V.) et FREHDEN (O.). — *Microchemie* 1934, *15,* 9..
23. FOUGIER (R.). — Thèse Pharmacie Marseille, 1951.
24. FREUNDEMBERG (K.). — *Naturwiss.* 1939, *27,* 850.
25. GHIGLIONE (C.), LEBOURHIS-SAUER (J.) et FONDARAI (J.). — *Bull. Soc. Pharm. Marseille.* 1965, *14,* 183.
26. GILBERT (G.A.). — *Stärke.* 1958, *10,* 95.
27. GILLIS (J.). — *Bull. Soc. Chim. Belg.* 1921, *30,* 114.

29. GODDU (R.F.), LEBLANC (N.F.) et WRIGHT (C.M.). — *Anal. Chem.* 1955, *27*, 125.

30. HABERMANN (J.). — *Ann. d. Chem.* 1874, *172*, 11.

31. HAUTON (J.C.). — *J. Chrom.* 1962, *9*, 257.

32. HAUTON (J.C.) et GREUSARD (C.). — *Bull. Soc. Pharm. Marseille.* 1956, *15*, 31.

33. HAWORTH (W.N.), HIRTS (E.L.) et WEBB (J.I.). — *J. Chem. Soc. London.* 1928, *131*, 2681.

34. HAWORTH (W.N.), PEAT (S.) et SAGROTT (P.E.). — *Nature, London.* 1946, *157*, 19.

35. HESS (K.) et FRIESE (A.). — *Ann. Chem.* 1927, *456*, 49.

36. HESS (K.) et PLEGER (R.). — *Ann. Chem.* 1933, *507*, 4854.

37. HIRTS (E.L.), HOUGH (L.) et JONES (J.K.N.). — *J. Chem. Soc.* 1948, 27.

38. HIRTS (E.L.), JONES (J.K.N.) et ROUDIER (A.J.). — *J. Chem. Soc.* 1948, 1779

39. HOBSON (P.N.), PIRT (S.J.), WHELAN (W.J.) et PEAT (S.). — *J. Chem. Soc.* 1951, 108.

40. HOENIG (M.) et RUZICKA (W.). — *Biochem. Ztschr.* 1930, *218*, 397.

41. HOPKINS (R.H.) et JELINEK (B.). — *Biochem. J.* 1948, *43*, 28.

42. JORPES (J.E.) et BLONDE (P.). — *Techn. Pharm.* 1957, *4*, 10.

43. KARRER (P.), KOENIG (H.) et USTERI (E.). ... *Helv. Chem. Acta*, 1943. *26*, 1296.

44. KEER (R.W.). — Chemistry and Industry of Starch. N.Y. 1944. Chap. VIII.

45. KUHN (R.). — *Lieb. Ann.* 1925, *443*, 1.

46. LE CORVAISIER (H.) et SOLAUN (A.). — IX° Congresso Internazionale Industrie Agrarie. Roma. 1952.

47. LEULIER (A.). — *J. Pharm. et Chim.* 1915, *18*, 291.

48. LING (A.R.) et NANJI (D.R.). — *Biochem. J.* 1923, *17*, 593

49. LING (A.R.) et NANJI (D.R.). — *J. Chem. Soc.* 1923, *123*, 2666.

50. LINTNER (C.J.). — *J. prak. Chem* 1886, *34*, 378.

51. LINTNER (C.J.). — *Ztschr. Ang. Chem.* 1890, 546.

52. MAC WILLIAM (I.C.) et PARCIVAL (E.G.V.). — *J. Chem. Soc.* 1951, 2259.

53. MAQUENNE (L.). — *Ann. Chim. et Phys.* 1904, *2*, 109.

54. MAQUENNE (L.) et ROUX (E.). — *Ann. Chim. et Phys.* 1906, *9*, 197.

55. MALFITANO (G.) et CATOIRE (M.). — *C.R.Ac.Sc.* 1922, *174*, 1128.

56. MALFITANO (G.) et CATOIRE (M.). — Les grandeurs des unités micellaires, Paris, HERMANN Ed. 1934.

57. MEYER (K.H.), BRENTANO (W.) et BERNFELD (P.). — *Helv. chem. Acta.* 1940, *23*, 845.

58. NORDIN (P.). — *Arch. Biochem. Biophys.* 1962, *99*, 101.

59. NORTHCOTE (D.H.). — *Biochem. J.* 1954, *58*, 353.

60. PEISER (E.). — *Z. physiol. Chem.* 1926, *161*, 214.

61. PRINGSHEIM (H.). — *Ber. dtsch. Chem. Ges.* 1921, *54*, 3162.

62. PRINGSHEIM (H.). — *Ber. dtsch. Chem. Ges.* 1922, *55*, 1425.

63. PRINGSHEIM (H.). — *Ber. dtsch. Chem. Ges.* 1926, *57*, 1579.

64. PRINGSHEIM (H.). — *C.R. Acad. Sc.* 1908. *146*, 540.

65. PRINGSHEIM (H.) et MEYERSHON (P.). — *Z. physiol. Chem.* 1927, *173*, 215.

66. REEVES (R.E.) et BLOUIN (F.A.). — *J. Amer. Chem. Soc.* 1957, *79*, 2261.

66. REICH (W.S.) et DAMANSKY (A.F.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1937, *19*, 158 et 357.

67. ROBERTS (E.A.). — The microstructure of starch grains, SALEM. Massachusetts. 1956.

68 RUNDLE (R.E.) et BALDWIN (R.R.). — *J. Amer. Chem. Soc.* 1943, *65*, 554.

69. RUNDLE (R.E.), BALDWIN (R.R.) et FRENCH (D.). — *J. Amer. Chem. Soc.* 1943, *65*, 558.

70. SAMEC (M.). — *Kolloidch. Beihefte.* 1914, *6*, 23.

71. SCHOCH (T.J.). — *J. Amer. Chem. Soc.* 1942, *64*, 2954.

72 SCHOCH (T.J.). — *Adv. Carbohydrate Chemistry.* 1945, *1*, 247.

73 STEYERMARK (A.). — Quantitative Organic microanalysis. 2 Ed. Academic Press. N. Y. and London. 1961, p. 528.

74 SUTRA (R.). — Contribution à l'étude de la constitution de l'amidon, Actualités scientifiques et industrielles. Hermann Ed. Paris, 1935.

75. SUTRA (R.). — *Soc. Chim. Fr.* 1950, 294.

76 SUTRA (R.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1959, *41*, 363.

77. VANHEMS (G.). — Thèse Doctorat Pharmacie, Lyon, 1936.

78. VINCENT (D.). — *Toulouse Pharm.* 1958, *5*, 17.

79. WHELAN (W.J.), BAILEY (J.M.) et ROBERTS (P.J.P.). — *J. Chem. Soc.* 1953, 1293.

80. WHELAN (W.J.) et ROBERTS (P.J.P.). — *J. Chem. Soc.* 1953, 1298.

81. WHISTLER (R.L.) et HILBERT (G.E.). — *J. Amer. Chem. Soc.* 1945, *67*, 1161.

82. WICKBERG (B.). — *Acta Chem. Scand.* 1958, *12*, 615.

83. WOLFF (J.) et FERNBACH (A.). — *C.R. Acad. Sc.* 1905, *140*, 1403